

**DIE OXYDATION VON
NIKOTINAMID-ADENIN-DINUKLEOTID-
PHOSPHAT-SYSTEMEN DER RATTENLEBER
DURCH AMMONIUMIONEN UND
HYDROPEROXYDE**

Karl-Heinz Summer

1976

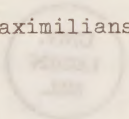


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553810_0015

DIE OXYDATION VON NIKOTINAMID-ADENIN-DINUKLEOTID-PHOSPHAT-
SYSTEMEN DER RATTENLEBER DURCH AMMONIUMIONEN
UND HYDROPEROXYDE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Karl-Heinz Summer
aus Überlingen

1976



1. Berichterstatter: PD. Dr. H. Sies, Wiss. Rat
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.5.1976

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. H. Sies, Wiss. Rat, in der Zeit von Januar 1974 bis März 1976 im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München durchgeführt [Vorstände: Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher, Prof. Dr. E. M. Klingenberg, Prof. Dr. F. Miller und Prof. Dr. H. G. Zachau].

Herrn Privatdozent, Dr. H. Sies danke ich für die Überlassung des Themas und besonders für die intensive und effektive Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit und für lehrreiche Diskussionen.

Herrn D. Häussinger und Herrn M. Großkopf danke ich für freundschaftliche Diskussionen, Frau A. Marklstorfer und Frä. I. Linke danke ich für ihre freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>I</u> <u>EINLEITUNG</u>	1
I/1 Problemstellung	3 a
<u>II</u> <u>METHODIK</u>	4
II/1 Hämoglobinfreie Leberperfusion	4
II/2 Isolierung und Inkubation von Leberzellen	5
II/3 Frierstop und Extraktionsverfahren	7
II/4 Metabolit-Analysen	8
II/5 Reagenzien, Enzyme und Abkürzungen	10
II/6 Geräte	12
<u>III</u> <u>ERGEBNISSE</u>	13
III/1 Gewebsgehalte von Pyridinnukleotiden in der Rattenleber	13
III/2 Mitochondriales NADP[H]	14
III/2/1 Gehalte	14
III/2/2 Mitochondriale NADPH-Oxydation durch Ammoniumionen	15
III/2/3 Der Effekt von Rhein auf die Harnstoffsynthese aus Ammon- iumionen und Glutamin	21
III/3 NADPH-Oxydation durch organische Hydro- peroxyde	25
III/3/1 Einleitung	25
III/3/2 Die Reduktion von tert.-Butyl- hydroperoxyd und die Oxydation von NADPH	26

	Seite
III/3/3 Der Einfluss von tert.-Butyl- hydroperoxyd auf die Harnstoff- synthese aus Ammoniumionen	34
<u>IV DISKUSSION</u>	38
IV/1 Das NADP[H]-System der Mitochondrien und die Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen	38
IV/2 NADP[H]- und Thiol-Redoxsysteme	39
<u>V ZUSAMMENFASSUNG</u>	44
<u>VI LITERATURVERZEICHNIS</u>	46

I EINLEITUNG

Die in den Jahren 1933-36 von Warburg [1,2] entdeckten Pyridinnukleotide, heute auch als Nikotinamid-Nukleotide bezeichnet, beeinflussen als Transportmetabolite für Wasserstoff und als Coenzyme von über 150 bekannten Dehydrogenasen das gesamte, vielfach verzweigte und regulierte Netz der zellulären Redoxreaktionen [Schema 1a]. Die Kenntnis der Redoxzustände, bzw der über die Nernst'sche Gleichung erhaltenen Potentiale der Pyridinnukleotidsysteme ist eine Voraussetzung für das Verständnis der Flüsse und der Energetik von Stoffwechselwegen.

Schon in den 50iger Jahren wurde in den Arbeitskreisen von Bücher und Lynen [3,4, Zusammenfassung siehe 11] erkannt, daß es zur Bestimmung der Redoxzustände der Pyridinnukleotide nicht genügt, die Nukleotidgehalte in den einzelnen Zellkompartimenten nach den üblichen Extraktionsverfahren [vgl. Abschnitt II] zu messen, denn die Konzentration, bzw die Aktivität der freien Pyridinnukleotide ist die thermodynamisch relevante Größe.

Die Redoxzustände der freien NAD[H]-Systeme in Cytosol und Mitochondrien können nach der Indikator-metabolitpaar-Methode [3,4,12] experimentell bestimmt werden. Über die Substrate der Lactatdehydrogenase und β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase ergeben sich NAD[H]-Redoxpotentiale im Cytosol und den Mitochondrien der Rattenleber von -250 mV [13], bzw -290 bis -310 mV [14,8].

CYTOSOL

Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
 Lactatdehydrogenase
 Alkoholdehydrogenase
 Malatdehydrogenase



Metabolit-Shuttlesysteme



α-Ketoglutarat-Dehydrogenase
 Isocitratdehydrogenase [NAD]
 β-Hydroxyacyl-Dehydrogenase
 NADH-Dehydrogenase
 Malatdehydrogenase
 β-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase

energieabhängige Transhydrogenase

Fettsäuresynthetase-Komplex
 Monoxygenasen
 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
 Isocitratdehydrogenase [NADP]
 Glutathion-Reduktase
 Malat-Enzym



Metabolit-Shuttlesysteme



Glutamat-Dehydrogenase
 Isocitratdehydrogenase [NADP]
 Glutathion-Reduktase

Schema 1a : Die Pyridinnukleotid-Systeme im Cytosol und den Mitochondrien der Leberzelle und ihre wichtigsten Beziehungen zum Intermediärstoffwechsel.

Für die NADP[H]-Systeme bestehen noch offene Fragen, denn die Indikatormetabolitpaar-Methode ist für diese Systeme nur bedingt anwendbar. Für das Cytosol der Rattenleber werden ungefähr übereinstimmende NADP[H]-Redoxpotentiale von etwa -400 mV beschrieben [15-17]. In der Einschätzung der mitochondrialen NADP[H]-Redoxpotentiale bestehen noch beträchtliche Unterschiede. Für die Mitochondrienmatrix werden derzeit NADP[H]-Redoxpotentiale von -310 mV [14,18], -397 mV [19] und bis zu -450 mV [20] angenommen. Der dieser Potentialdifferenz von -140 mV entsprechende Unterschied im Quotienten der freien NADPH/NADP^+ beträgt 4×10^4 .

Außerdem noch weitgehend unbekannt ist die Bedeutung des mitochondrialen NADPH für den zellulären Stoffwechsel.

Im folgenden wird gezeigt werden, daß die intramitochondriale, zu Harnstoff führende Umsetzung von Ammoniumionen in der Rattenleber zu einer beträchtlichen Oxydation von NADPH führt. Die reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat zu Glutamat ist als biosynthetische Funktion des NADPH in der Mitochondrienmatrix insbesondere deshalb interessant, weil die übrigen NADPH-verbrauchenden Prozesse der Leber, wie beispielsweise die Fettsäuresynthese oder die mischfunktionelle Oxydation, im Cytoplasma lokalisiert sind.

I/1 Problemstellung

Die NADP[H]-Systeme in Cytosol und Mitochondrien der Rattenleber sollten durch die Auslenkung von Fließgleichgewichten, d.h. während des Ablaufs von Stoffwechselprozessen, mit Hilfe permeabler Substrate untersucht und charakterisiert werden. Als "Oxydants" wurden Ammoniumionen und organische Hydroperoxyde eingesetzt.

Durch die Verwendung der Ammoniumionen sollte auch eine Antwort auf die noch offene Frage nach der Beziehung zwischen der Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen und den mitochondrialen NAD[H]- und NADP[H]-Systemen gefunden werden.

Die Umsetzung der Hydroperoxyde steht über die Glutathion-Peroxydase und -Reduktase mit den zellulären NADP[H]-Systemen und dem Glutathion-Redoxsystem in Verbindung. Es sollte geprüft werden, inwieweit organische Hydroperoxyde als Modell zur Perturbation von NADP[H]-Systemen der Leberzelle herangezogen werden können.

Die Experimente wurden am offenen System der isolierten, hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber und an isolierten Rattenleberzellen durchgeführt.

II METHODIK

II/1 Hämoglobinfreie Leberperfusion

Die Lebern männlicher Ratten vom Stamm Wistar II mit einem Körpergewicht von 120-190 g wurden nach der in [21, 22] beschriebenen Methode perfundiert. Die Tiere wurden mit Altromin-Standardnahrung und Wasser ad libitum gefüttert. Auf die Verwendung von gehungerten Tieren wird bei der Beschreibung der Experimente hingewiesen. Vor der etwa 6 Minuten dauernden Operation wurden die Tiere mit Nembutal [1.0 ml pro kg Körpergewicht, i.p.] narkotisiert und die Blutgerinnung durch die i.v. Gabe von Heparin [1000 IE Liquemin pro kg Körpergewicht] herabgesetzt.

Das Perfusat durchströmte die Leber von der vena portae zur vena cava inf. mit einer Geschwindigkeit von 3-4 ml pro Minute pro g Leber. Es wurde nicht rezirkuliert [offenes System]. In der Tabelle 1 ist die Zusammensetzung des verwendeten Perfusionsmediums [Bikarbonatpuffer, pH 7.4] aufgeführt.

Salz	Salzkonzentration [mM]
NaCl	115.0
KCl	5.9
MgCl ₂	1.2
CaCl ₂	2.5
NaH ₂ PO ₄	1.2
Na ₂ SO ₄	1.2
NaHCO ₃	25.0

Tab. 1: Zusammensetzung des Perfusionsmediums.

Falls keine anderen Angaben gemacht werden, betrugen die Konzentrationen von L-Lactat und Pyruvat im Perfusat jeweils 0.3 mM [Lactat/Pyruvat = 1].

Das Perfusat wurde durch einen Silikonschlauchoxygenator [nach R. Scholz] mit einem Gemisch von O_2/CO_2 [95:5, v/v] äquilibriert. Die Temperatur an der Leberoberfläche betrug 37°C. Die Zugabe von neutralisierten Substanzen in das Perfusat erfolgte kontinuierlich durch Präzisionsmikropumpen.

II/2 Isolierung und Inkubation von Leberzellen

Leberzellen wurden, in Anlehnung an die ursprünglich von Berry und Friend [23] vorgeschlagene Methode, aus Rattenlebern isoliert die mit Kollagenase-haltigem Medium perfundiert worden waren. Die Perfusion erfolgte wie vorstehend beschrieben, nur mit dem Unterschied, daß das Calciumchlorid im Medium durch 10 mM Glucose ersetzt wurde. Nach 15 Minuten Perfusion im offenen System wurde das System geschlossen [Gesamtvolumen 100 ml] und 40 mg Kollagenase [Boehringer, aus *Clostridium histolyticum*, ca. 0.15 U/mg] zugesetzt. Nach weiteren 20 Minuten Perfusion wurde die Leber in eine Schale mit etwa 50 ml O_2/CO_2 -begastem Medium überführt [37°C] und das Lebergewebe mit einem Plastikspatel aus der Leberkapsel gestrichen. Nach der etwa 10 Minuten dauernden Sedimentation in weiten Zentrifugenröhrchen wurde die Suspension einmal in Ca^{2+} -freiem Medium gewaschen und anschließend durch ein Gazefilter filtriert.

Nach zwei weiteren Waschungen mit Calcium-haltigem Medium [2.5 mM CaCl_2] wurde das Sediment, im folgenden Leberzellen genannt bei 0°C aufbewahrt. Die Kupffer'schen Sternzellen wurden durch Absaugen der langsam sedimentierenden Zellen und Zellbruchstücke weitgehend entfernt.

Zur Beurteilung der Zellpräparationen wurde der Ausschluß von Trypanblau [größer als 95 %] und die Biosynthese von Harnstoff aus Ammoniumionen routinemäßig überprüft. Die Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen [5 mM] verlief über die Versuchszeit von 15 Minuten linear mit einer Geschwindigkeit von 1.4 μMol Harnstoff pro Minute pro g Leberzellen Feuchtgewicht.

Die Inkubation der Leberzellen erfolgte im Perfusionsmedium der Tabelle 1 bei 37°C in einer Atmosphäre aus O_2/CO_2 [95:5, v/v, offenes System bezüglich dem Gasaustausch]. Der Inkubationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 1.5 bis 2 ml, enthielt 6 bis 18 mg Zellprotein. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten, wurde die Suspension magnetisch gerührt. Der Sauerstoffverbrauch wurde gelegentlich durch eine Sauerstoffelektrode in der Suspension kontrolliert. Substanzen wurden aus konzentrierten, neutralisierten Stammlösungen mit Mikroliterspritzen zugegeben. Jeweils am Ende eines Experiments wurden Proben zur Bestimmung des Proteingehalts entnommen. Die gelegentlich im Überstand der Zellen gemessene Aktivität der Lactatdehydrogenase war kleiner als 20 % der Gesamtaktivität.

II/3 Frierstop und Extraktionsverfahren

Zur Bestimmung der Metabolitgehalte der perfundierten Leber nach der Frierstop-Methode [24] wurde der linke Lebervorderlappen durch eine in flüssigem Stickstoff vorgekühlte Aluminiumzange zu einer 1 mm dicken planparallelen Platte zusammengepresst. Das gefrorene Gewebe wurde bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs in einem Stahlmörser pulverisiert, gewogen und anschließend zum sauren und alkalischen Extrakt weiterverarbeitet [22,25].

Die saure Extraktion erfolgte mit 0.6 N Perchlorsäure in 40 %iger [v/v] alkoholischer Lösung bei etwa -25°C. Das Verhältnis von Gewebspulver zu Säure betrug 5 zu 1 [v/w]. Nach kurzer Ultraschallbehandlung [2-4 Sekunden] und der Abtrennung des denaturierten Proteins durch Zentrifugation [10 Minuten, 10^4 g, Raumtemperatur] wurde der Überstand mit 2 N K_2CO_3 auf einen pH von 4-6 eingestellt und das entstandene Kaliumperchlorat durch Zentrifugation in der Kälte abgetrennt.

Das pro g Gewebseinwaage erhaltene Extraktvolumen errechnet sich nach folgender Beziehung:

$$\frac{[C + B]}{A} \times \frac{E}{D} \quad [\text{ml Extrakt pro g Gewebe}]$$

A = Gewebseinwaage in g

B = Gewebswasser in ml [als 80 % von A angenommen]

C = zugegebene Perchlorsäure in ml

D = Überstand nach der Protein-Abtrennung in ml

E = Überstand nach der Neutralisation in ml

Auf Grund der Instabilität der reduzierten Pyridinnukleotide im sauren pH-Bereich, wurde ein Teil des gefrorenen Gewebepulvers mit alkoholischer [40 %, v/v] 0.5 N KOH bei -17°C extrahiert. Nach der Hitzedenaturierung [5 min, 90°C] wurde der pH mit einem Triäthanolamin-Phosphat-Puffer [0.5 M TRA, 0.4 M KH_2PO_4 , 0.1 M K_2HPO_4 , pH 5.7] auf 7.6 - 7.8 eingestellt. Um Fehler durch die nichtenzymatische Alterung der reduzierten Pyridinnukleotide zu vermeiden, wurden die Nukleotide möglichst umgehend nach der Abtrennung des denaturierten Proteins durch Zentrifugation [5 min, $3 \times 10^4 \text{ g}$] gemessen. Der Extrakt-Verdünnungsfaktor errechnet sich analog wie beim sauren Extrakt.

Zur sauren Extraktion der Zellen wurde ein Aliquot der inkubierten Zellsuspension zu eiskalter 8 N Perchlorsäure gegeben [Endkonzentration der Säure 1.1 N, bzw 7.2 %]. Nach Ultraschallbehandlung [1-2 Sekunden] und Zentrifugation bei 0°C wurde ein Aliquot des Überstandes mit 1 M TRA, 1.65 M K_2CO_3 [pH 9.8] bis zu einem pH von 4 - 6 neutralisiert und das entstandene KClO_4 in der Kälte abzentrifugiert.

Die alkalische Extraktion der Zellen erfolgte mit alkoholischer 1 N KOH [Endkonzentration der KOH 0.33 N] bei 0°C . Die weitere Extraktbereitung verlief analog der alkalischen Extraktion des Lebergewebes.

II/4 Metabolit-Analysen

Die Bestimmung der Metabolite NAD[H], NADP[H], L-Lactat,

Pyruvat, β -Hydroxybutyrat, Acetoacetat, Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, Glycerin-3-Phosphat, ATP, ADP und AMP erfolgte durch enzymatisch-optische Tests nach den in [25, 26] beschriebenen Methoden. Die nur in kleinen Konzentrationen vorliegenden Metabolite, wie beispielsweise die Pyridinnukleotide, wurden fluorimetrisch bestimmt.

Das Fehlen störender Enzymaktivitäten im Perfusat ermöglichte es, L-Lactat, Pyruvat, β -Hydroxybutyrat, Acetoacetat, Harnstoff, Ammoniumionen, Glutathiondisulfid und Hydroperoxyde auch im nicht enteweißten Perfusat zu bestimmen.

Ammoniumionen und Harnstoff wurden nacheinander in einem Testansatz mit Glutamat-Dehydrogenase und Urease bestimmt [26,27].

Der Reaktionsansatz für die Bestimmung des oxydierten Glutathions [GSSG] bestand aus 0.3 ml Probe, 0.3 ml Phosphatpuffer [0.1 M, pH 7.6] mit 1 mM EDTA und NADPH in der Endkonzentration von 30 - 50 μ M. Nach der Zugabe von 0.6 U Glutathion-Reduktase [Boehringer, aus Hefe] wurde die Abnahme der Extinktion bei 340 nm photometrisch bestimmt. Nach Ablauf des Tests zur Kontrolle zugegebenes GSSG wurde zu 95-105 % wiedergefunden.

Die organischen Hydroperoxyde wurden durch einen gekoppelten enzymatisch-optischen Test bestimmt [28]. Der Reaktionsansatz bestand aus 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7, 1 mM EDTA, 0.2 mM NADPH, 0.5 mM reduziertes Glutathion und 0.6 U Glutathion-Reduktase [Boehringer, aus Hefe]. Die Reaktion wurde mit soviel Glutathion-Peroxydase gestartet, daß die

Testdauer etwa 6 bis 10 Minuten betrug [zum Reaktionsablauf vgl. Schema 2].

Die Bestimmung des aus 1- ^{14}C -Glucose gebildeten $^{14}\text{CO}_2$ [vgl. Abb. 10] erfolgte nach [29]. Das Perfusat enthielt 10 mM Glucose, die Radioaktivität betrug 8.5 nCi/ml. Die Geschwindigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung wurde über die spezifische Aktivität der Glucose im Perfusat berechnet.

Protein wurde nach der Biuret-Methode bestimmt [30]. Die nach 30 Minuten Inkubation bei 546 nm ermittelte Extinktion des Testansatzes wurde mit einer Eichkurve auf Rinderserumalbumin bezogen.

II/5 Reagenzien, Enzyme und Abkürzungen

L-Glutamin stammte von Sigma Chem. Co., St. Louis, L-Lactat und Hydrazinhydrat von Roth, Karlsruhe, 1- ^{14}C -Glucose von NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain.

Tert.-Butyl- und Cumolhydroperoxyd wurden freundlicherweise von der Fa. Peroxyd-Chemie GmbH, München, das reduzierte Glutathion von der Fa. Pharma-Waldhof GmbH, Mannheim und das Rhein von der Fa. Sandoz, Basel zur Verfügung gestellt.

Die Glutathion-Peroxydase aus Rindererythrozyten wurde freundlicherweise von L. Flohé, A. Günzler und A. Wendel [Physiologisch-chemisches Institut der Universität Tübingen] zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen Reagenzien stammten von Merck, Darmstadt,

die Biochemikalien und die übrigen Enzyme von Boehringer, Mannheim.

Die folgende Aufstellung enthält die in dieser Arbeit erwähnten und verwendeten Enzyme mit Abkürzungen und den EC-Nummern [31].

Alkoholdehydrogenase	ADH	EC	1.1.1.1
AMP-Deaminase		EC	3.5.4.6
Arginase		EC	3.5.3.1
Argininosuccinat-Lyase		EC	4.3.2.1
Argininosuccinat-Synthetase		EC	6.3.4.5
Carbamylphosphat-Synthetase		EC	2.7.2.5
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	G6PDH	EC	1.1.1.49
Glutamat-Dehydrogenase	GLDH	EC	1.4.1.3
Glutamat-Oxalacetat-Aminotransferase		EC	2.6.1.1
Glutaminase		EC	3.5.1.2
Glutaminsynthetase		EC	6.3.1.2
Glutathion-Peroxydase	GSH-POD	EC	1.11.1.9
Glutathion-Reduktase	GR	EC	1.6.4.2
Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase	GDH	EC	1.1.1.8
β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase		EC	1.1.1.30
Isocitratdehydrogenase [NADP]	ICDH	EC	1.1.1.42
Lactatdehydrogenase	LDH	EC	1.1.1.27
Malat-Enzym [malic enzyme]	ME	EC	1.1.1.40
Malatdehydrogenase	MDH	EC	1.1.1.37
Myokinase	MK	EC	2.7.4.3
NAD[P]-Transhydrogenase		EC	1.6.1.1
Ornithin-Carbamylphosphat-Transferase		EC	2.1.3.3
Phosphoglucose-Isomerase	PGI	EC	5.3.1.9
Pyruvatdehydrogenase	PDH	EC	1.2.4.1
Pyruvatkinase	PK	EC	2.7.1.40
Urease		EC	3.5.1.5

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
t.-BOOH	Tert.-Butylhydroperoxyd
COOH	Cumolhydroperoxyd
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxydiertes Glutathion [Glutathiondisulfid]
NAD ⁺	oxydiertes Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleo- tid
NADH	reduziertes Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleo- tid
NADP ⁺	oxydiertes Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleo- tid-Phosphat
NADPH	reduziertes Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleo- tid-Phosphat
Rhein	4,5-Dihydroxyanthrachinon-2-Carbonsäure
TRA	Triäthanolamin

II/6 Geräte

Photometer Eppendorf, Photometer Eppendorf mit Fluoreszenzzusatz [Primärfilter 366 nm, Sekundärfilter > 405 nm], Hitachi UV-VIS Spektralphotometer, Modell 181, Perkin-Elmer Spektralphotometer, Modell 156.

Extinktionsdifferenzmessungen in Leberzell suspensionen erfolgten nach dem Zweiwellenlängenprinzip mit einem von Dr. H. Schwab und Mitarbeitern [Elektronik-Abteilung des Sonderforschungsbereiches Medizinische Molekularbiologie und Biochemie, München] konstruierten Photometer.

III ERGEBNISSE

III/1 Gewebsgehalte von Pyridinnukleotiden in der Rattenleber

Zur Unterscheidung der nach der Frierstopmethode bestimmten Metabolitmenge von der Konzentration und von der thermodynamischen Konzentration [Aktivität] verwenden wir nach Bücher und Klingenberg [4] den Begriff Gehalt. Der Gewebsgehalt ist das Ergebnis einer "Über-Alles"-Bestimmung, wobei die Substratmenge üblicherweise auf eine bestimmte Masse Gewebsprotein oder Gewebe bezogen wird.

Die in der Tabelle 2 aufgeführten neueren Bestimmungen der Gesamtgehalte der Pyridinnukleotide der Rattenleber wurden durch photo- und fluorimetrische Messungen in friergestoppten und extrahierten Gewebsproben erhalten [vgl. Abschnitt II].

Autoren	Lit.	NAD	NADH	NAD ⁺	$\frac{\text{NADH}}{\text{NAD}}$	NADP	NADPH	NADP ⁺	$\frac{\text{NADPH}}{\text{NADP}}$
Klingenberg									
[1960]	[19]	640	160	800	0.25	110	320	430	2.9
Bücher et al									
[1964]	[32]	570	90	660	0.16	70	250	320	3.6
Krebs und									
Veech [1969]	[14]	760	140	900	0.18	70	310	380	4.4
Lagunas et al									
[1970]	[33]	746	160	906	0.22	55	289	344	5.3
Sies et al									
[1974]	[34]	546	70	616	0.13	73	240	313	3.3

Tab. 2: Pyridinnukleotid-Gewebsgehalte und deren Quotienten in der Rattenleber; in nMol/g Leber feucht.

III/2 Mitochondriales NADP[H]

III/2/1 Gehalte

Die Mitochondrien der Rattenleber, durchschnittlich ca. 1600 mit einem Gesamtvolumen von 22 % des Zellvolumens [35] und einem Proteingehalt von etwa 35 % des Zellproteins, enthalten etwa 35 % der zellulären Nikotinamid-Nukleotide. Etwa 67 % der mitochondrialen Nikotinamid-Nukleotide sind Triphosphopyridinnukleotide, etwa 33 % Diphosphopyridin-nukleotide [6,Tab.2,3].

Autoren	Lit.	NAD	NADH	NAD+ NADH		NADP	NADPH	NADP+ NADPH	
				NADH	NAD			NADPH	NADP
Jacobson u.									
Kaplan[1957]	[5]	84	36	120	0.43	24	228	252	9.5
Papenberg et al									
[1961]	[36]	32	97	129	3.0	11	200	211	18.2
Klingenberg									
[1961]	[37]	117	84	201	0.72	--	---	290	--
Heldt et al									
[1965]	[38]	--	--	--	--	16	236	252	14.8
Williamson									
[1969]	[19]	70	37	107	0.53	21	122	143	5.8

Tab. 3: Pyridinnukleotid-Gehalte und deren Quotienten in isolierten Rattenlebermitochondrien. Gehalte in nMol pro g Leber Feuchtgewicht.
Annahme: 60 mg Mitochondrienprotein pro g Leber Feuchtgewicht [21].

Im Gegensatz zur äußeren Membran der Mitochondrien ist die innere, die Mitochondrienmatrix umgebende Membran, für Nikotinamid-Nukleotide impermeabel [7], d.h. es sind verschiedene Gehalte und Redoxzustände der funktionell wie räumlich vom übrigen Zellstoffwechsel getrennten Pyridinnukleotide möglich.

Eine Auswahl der von verschiedenen Autoren veröffentlichten Gewebsgehalte und Redoxquotienten der Nikotinamid-Nukleotide isolierter Rattenlebermitochondrien ist in der Tabelle 3 aufgeführt. Der Vergleich der Quotienten der Gewebsgehalte zeigt eine bis um das 10-fach stärkere Reduktion des mitochondrialen NADP[H]-Systems gegenüber dem NAD[H]-System.

III/2/2 Mitochondriale NADPH-Oxydation durch Ammoniumionen

Eine Erhöhung der intramitochondrialen Konzentration freier Ammoniumionen führt durch die Reaktion der Glutamat-Dehydrogenase in isolierten Mitochondrien [92,39], der intakten, perfundierten Leber und in isolierten Leberzellen [40-42] zu einer Oxydation von Pyridinnukleotiden. Der halbmaximale Effekt dieser Oxydation tritt in der perfundierten Leber bei einer Ammoniumionenkonzentration im Perfusat von 0.3 - 0.5 mM, der maximale Effekt bei etwa 3 mM auf.

Die isolierte Glutamat-Dehydrogenase reagiert mit NAD[H] und NADP[H] [43]; $K_{\text{NAD}} = 3.87 \times 10^{-6}$ M, $K_{\text{NADP}} = 2.49 \times 10^{-6}$ M [pH 7, 38°C, I = 0.25] [14]. Die Spezifität der Glutamat-Dehydrogenase für Pyridinnukleotide in vivo wird noch diskutiert [14,37,39,44,46-53,13].

Durch Gehaltsbestimmungen der reduzierten Nikotinamid-Nukleotide in isolierten Leberzellen, läßt sich die durch Ammoniumionen hervorgerufene Pyridinnukleotid-Oxydation der überwiegenden Oxydation von NADPH zuordnen [Abb. 1].

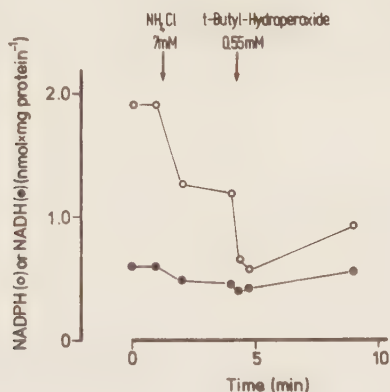


Abb. 1: Die Oxydation von NADH und NADPH durch Ammoniumionen und tert.-Butylhydroperoxyd in isolierten Leberzellen, 13.2 mg Zellprotein pro ml, 99 mg Zellprotein pro g Zellen Feuchtgewicht. Inkubationsbedingungen vgl. Abschnitt II, 2.1 mM Lactat, 0.3 mM Pyruvat, 2 mM Ornithin.

Die NADH- und NADPH-Gehalte in den jeweiligen stationären Zuständen der Umsetzung von Ammoniumionen und tert.-Butylhydroperoxyd [1 und 3 Minuten nach der NH_4Cl -Gabe, 40 Sekunden nach der Zugabe von tert.-Butylhydroperoxyd] sind in der Tabelle 4 einander gegenübergestellt.

Auch in der perfundierten Leber führt die Umsetzung von Ammoniumionen zu einer Oxydation von NADPH. Während

der Infusion von 1.4 mM NH_4Cl steigt der NADP-Gehalt der Leber bei unverändertem NAD-Gehalt von 68 auf 130 nMol NADP pro g Leber Feuchtgewicht [41].

Zugabe	nMol pro mg Zellprotein	
	NADPH	NADH
-----	1.92	0.56
NH_4Cl [7 mM]	1.16	0.48
NH_4Cl [7 mM] t.-BOOH [0.55 mM]	0.58	0.42

Tab. 4: NADH- und NADPH-Gehalte isolierter Leberzellen. Effekt von Ammoniumionen und tert.-Butylhydroperoxyd. Absolutbeträge in nMol pro mg Zellprotein in den jeweiligen stationären Zuständen aus der Abbildung 1.

Die Umsetzung der Ammoniumionen an der Glutamat-Dehydrogenase, d.h. die reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat zu Glutamat, ist zur Bildung von Harnstoff aus Ammoniumionen erforderlich [Schema 1].

Verfolgt man die Bilanz der Ammoniumionen, dann zeigt sich, daß die von der Leber aufgenommenen Ammoniumionen zu mehr als 90 % im Harnstoff gebunden werden. Dies wird ersichtlich aus der Konzentration der während der NH_4^+ -Infusion im Perfusat gebildeten Aminosäuren [vorwiegend Glutamin und Alanin] [54], dem Verhältnis von aufgenommenen Ammoniumionen zu gebildetem Harnstoff [Abb. 2] und aus

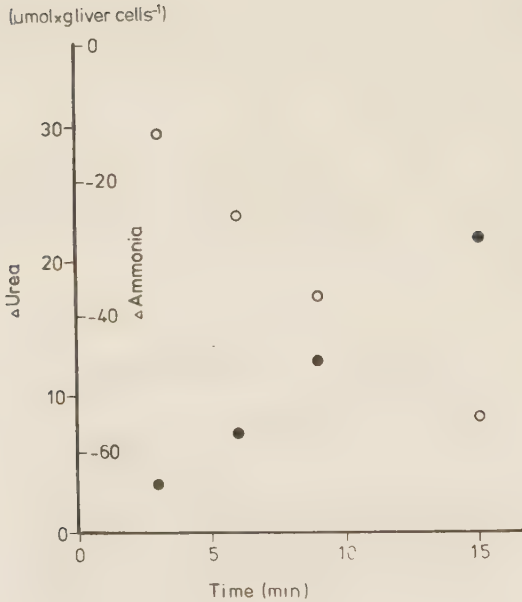


Abb. 2: Harnstoffbildung [●] und Verbrauch von Ammoniumionen [○] in isolierten Rattenleberzellen, 7.2 mg Zellprotein pro ml, 140 mg Zellprotein pro g Zellen Feuchtgewicht. Anfängliche NH_4Cl -Konzentration 3.8 mM, Inkubationsbedingungen vgl. Abschnitt II, 2 mM Ornithin.

Nach dem Schema 1, sollten die Mitochondrien während der Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen für jedes austretende Molekül Aspartat ein Molekül NADH aus dem aufgenommenen Molekül Malat bilden können, d.h. zumindest im stationären Zustand der Ammoniumionen-Umsetzung sollten keine wesentlichen Redoxveränderungen der mitochon-

drialen Pyridinnukleotide auftreten.

Die oben beschriebenen experimentellen Befunde zeigen jedoch, daß dies nicht der Fall ist. Die Umsetzung von Ammoniumionen in der Leber führt zu einer Pyridinnukleotid-Oxydation, die zu über 90 % eine NADPH-Oxydation ist. Die reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat zu Glutamat ist demnach weitgehend mit dem NADP[H]-Pool der Mitochondrienmatrix verbunden.

Diese Befunde werden auch unterstützt durch die qualitativen Parameter, wie die Fluoreszenzausbeuten der reagierenden Pyridinnukleotidsysteme [41,42,22], eine Rotverschiebung der Dihydrobande als Hinweis auf einen auch in situ vorliegenden ternären Komplex aus Glutamat-Dehydrogenase, L-Glutamat und NADPH [56], sowie durch den über die Indikatormetabolitpaar-Methode berechneten Anteil des mitochondrialen NAD[H]-Systems an der durch Ammoniumionen hervorgerufenen Oxydation der Pyridinnukleotide [11,41].

Ein weiteres Argument für die kontinuierliche Oxydation von mitochondrialem NADPH während der Umsetzung von Ammoniumionen zu Harnstoff ist der im folgenden Abschnitt beschriebene Effekt von Rhein auf die Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen und Glutamin.

III/2/3 Der Effekt von Rhein auf die Harnstoffsynthese
aus Ammoniumionen und Glutamin

Wie schon in Schema 1 angedeutet, könnte die energieabhängige Transhydrogenase durch die Wasserstoffübertragung von NADH auf NADP das mitochondriale NAD[H]-System mit dem durch Ammoniumionen oxydierbaren NADP[H]-System verbinden.

Kean et al [57], Moyle und Mitchell [20] und Hoek et al [39] beschrieben an isolierten Mitochondrien eine Hemmung der energieabhängigen Transhydrogenase durch 0.1 mM Rhein [4,5-Dihydroxyanthrachinon-2-Carbonsäure].

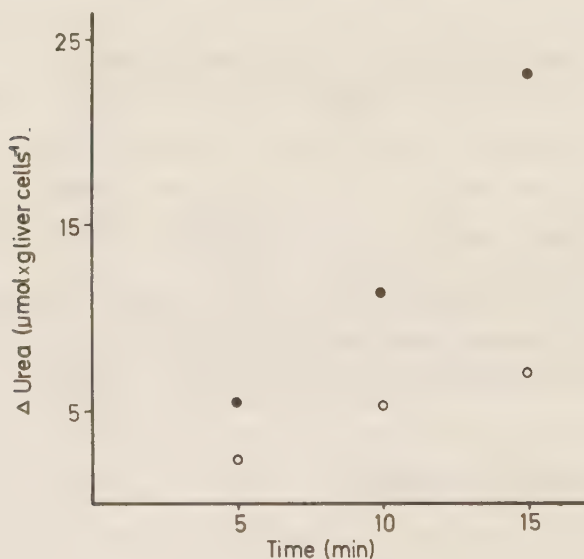


Abb. 3: Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen [5.4 mM] in isolierten Leberzellen. Effekt von Rhein [0.1 mM]. 6.9 - 7.6 mg Zellprotein pro ml, 92 mg Zellprotein pro g Zellen Feuchtgewicht, Inkubationsbedingungen vgl. Abschnitt II, 2 mM Ornithin. ohne Rhein [●], mit Rhein [○]

In isolierten Leberzellen wird die Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen [5.4 mM] durch Rhein [0.1 mM] um etwa 60 % gehemmt [Abb. 3].

Die Infusion von 63 μ M Rhein führt auch in der perfundierten Leber zu einer Hemmung der Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen [58, Abb. 4]. Während der Infusion von Rhein kommt es im Perfusat zu einer, der Hemmung der Harnstoffsynthese entsprechenden, reversibel erhöhten Ammoniumionenkonzentration [Abb. 4].

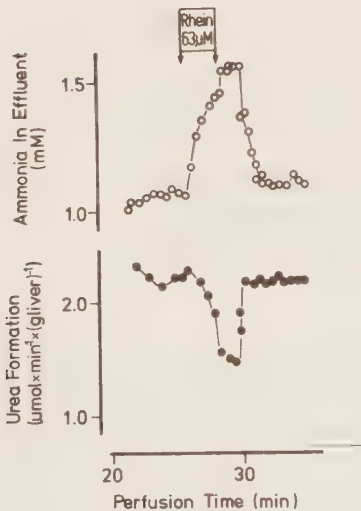


Abb. 4: Harnstoffbildung aus Ammoniumionen und die Konzentration von Ammoniumionen im ausströmenden Perfusat. Effekt von Rhein [63 μ M]. Mit 2 mM Ornithin im Perfusionsmedium.

Wie die Tabelle 5 zeigt, wird 5 Minuten nach der Gabe von 5.4 mM Ammoniumchlorid der NADP-Gehalt isolierter Leberzellen bei gleichbleibendem NAD-Gehalt durch Rhein stark erhöht [59]. Übereinstimmend beschreiben Hoek et al [39] in mit Glutamat, α -Ketoglutarat und Ammoniumionen

vorinkubierten Mitochondrien eine durch Rhein hervorgerufene starke NADPH-Oxydation ohne Beteiligung des NAD[H]-Systems.

Inkubation	nMol pro mg Zellprotein	
	NADP	NAD
NH ₄ Cl [5.4 mM]	0.38	4.3
NH ₄ Cl [5.4 mM] Rhein [0.1 mM]	0.95	4.1

Tab. 5: NADP- und NAD-Gehalte isolierter Leberzellen 5 Minuten nach der Zugabe von 5.4 mM Ammoniumchlorid. Effekt von Rhein [0.1 mM]. Inkubationsbedingungen vgl. Abschnitt II, 2 mM Ornithin. 12.5 - 12.8 mg Zellprotein pro ml, 129 mg Zellprotein pro g Zellen Feuchtgewicht. Nukleotidgehalte vor der NH₄Cl-Gabe 0.1 - 0.2 und 4.3 nMol NADP bzw NAD pro mg Zellprotein.

Um die Frage zu entscheiden ob Rhein noch auf andere Weise die Harnstoffsynthese beeinflusst, wurde anstatt den Ammoniumionen die Aminosäure Glutamin infundiert. Aus Glutamin wird durch die Aktivität der Glutaminase in den Mitochondrien kontinuierlich Ammoniak und Glutamat freigesetzt. Das zur Synthese des Harnstoffs erforderliche Aspartat wird dann ohne die Beteiligung der Glutamat-Dehydrogenase durch die Reaktion der Glutamat-Oxalacetat-Aminotransferase gebildet.

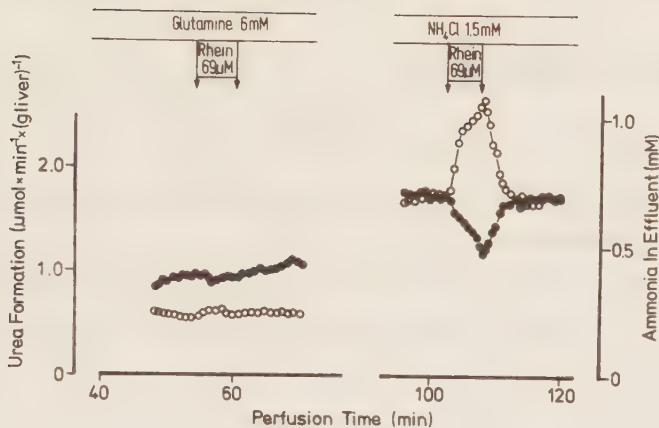


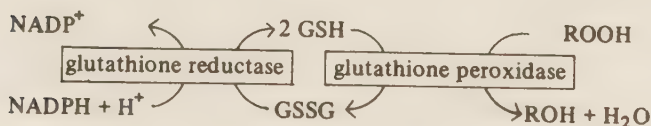
Abb. 5: Die Konzentrationen von Harnstoff [●] und Ammoniumionen [○] im ausströmenden Perfusat während der Infusion von Glutamin [6 mM] und Ammoniumchlorid [1.5 mM]. Effekt von Rhein [69 μM]. Perfusionsmedium vgl. Abschnitt II, 2 mM Ornithin. Aktivierung der Glutaminase nach [29].

Wie der Vergleich der Harnstoffsynthese aus Glutamin und Ammoniumionen zeigt [Abb. 5], wird die Harnstoffsynthese aus Glutamin durch Rhein nicht beeinflusst. Damit unterstützen auch diese Experimente den im vorigen Abschnitt erhobenen Befund, daß die Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen mit der durch die Glutamat-Dehydrogenase katalysierten reduktiven Aminierung von α-Ketoglutarat ein überwiegend NADPH-verbrauchender Prozess ist.

III/3 NADPH-Oxydation durch organische Hydroperoxyde

III/3/1 Einleitung

Neben den oben besprochenen Ammoniumionen wurde eine zweite Möglichkeit zur Oxydation von NADPH in der Leberzelle angewandt. Diese besteht in der Ausnutzung der in den Mitochondrien und im Cytosol vorkommenden Aktivitäten der Glutathion-Peroxydase [60-62] und Glutathion-Reduktase [63,64]. Durch Zusatz von Hydroperoxyden ließ sich das zelluläre NADPH nach dem Schema 2 oxydieren [25, 34,65,66].



Schema 2: Beziehungen zwischen dem Stoffwechsel der Hydroperoxyde und dem Glutathion- und NADP[H]-Redoxsystem.

Als Modellsubstanzen zur Oxydation der NADP[H]- und Glutathion-Redoxsysteme wurde tert.-Butylhydroperoxyd und Cumolhydroperoxyd in Erythrozyten [67], der isoliert perfundierten Rattenleber [34,66,68] und in isolierten Rattenleberzellen [65,66] eingesetzt. Die aus den Hydroperoxyden entstehenden Alkohole reagieren nicht mit der

Alkohol-Dehydrogenase [69].

III/3/2 Die Reduktion von tert.-Butylhydroperoxyd und
die Oxydation von NADPH

Tert.-Butylhydroperoxyd verursacht in isolierten Leberzellen eine schnelle Absorptionsabnahme bei Messung der Dihydrobande der Nikotinamid-Nukleotide bei 350 - 380 nm im Zweiwellenlängenverfahren [Abb. 6].

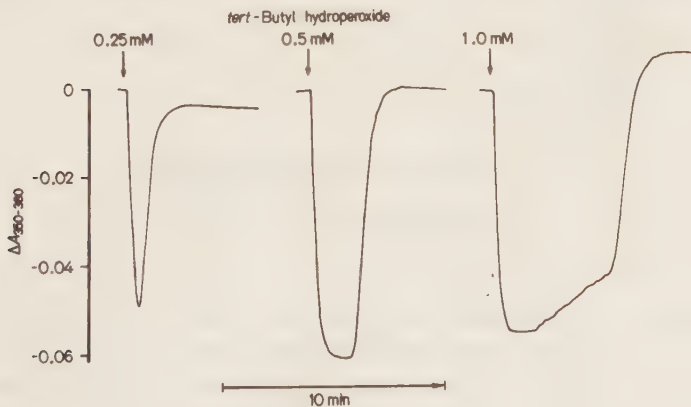


Abb. 6: Die Oxydation von Pyridinnukleotiden nach der Zugabe verschiedener Konzentrationen von tert.-Butylhydroperoxyd zu isolierten Leberzellen, 6.8 mg Zellprotein pro ml Inkubationsmedium. Inkubation vgl. Abschnitt II, 10 mM Glucose.

Aus den Abbildungen 6 und 8 ergibt sich eine Geschwindigkeit der Umsetzung von tert.-Butylhydroperoxyd in isolierten Leberzellen von 4 - 5 μMol tert.-Butylhydroperoxyd

pro Minute pro g Zellen Feuchtgewicht. Das entspricht etwa 3 - 4 μMol tert.-Butylhydroperoxyd pro Minute pro g Leber Feuchtgewicht [Abb. 7].

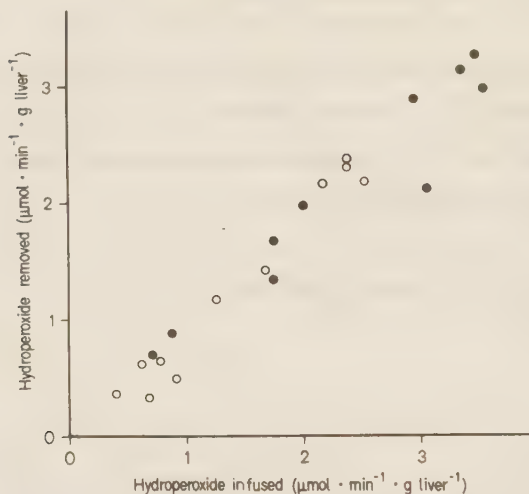


Abb. 7: Geschwindigkeiten der Umsetzung von tert.-Butylhydroperoxyd und Cumolhydroperoxyd in der perfundierten Rattenleber. Die Geschwindigkeiten wurden aus der Differenz von angebotenen und wiedergefundenen Konzentrationen der Hydroperoxyde im Perfusat, 3 - 5 Minuten nach Beginn der Hydroperoxydinfusion, errechnet. Tert.-Butylhydroperoxyd [●], Cumolhydroperoxyd [○].

Experimente mit höheren Geschwindigkeiten der Hydroperoxyd-Umsetzung als 3 μMol Hydroperoxyd pro Minute pro g Leber Feuchtgewicht, entsprechend 1 mM Hydroperoxyd im Perfusat [Durchflußgeschwindigkeit 30 ml/min], führen über

längere Zeit zu Leberschädigungen, die sich beispielsweise im Austritt von cytosolischen Markerenzymen, wie der Lactatdehydrogenase äußern. Die Aktivität der Lactatdehydrogenase im Perfusat betrug durchschnittlich 1 - 2 mU/ml. Sie nahm während der Infusion von 0.6 mM tert.-Butylhydroperoxyd über den Zeitraum von 15 Minuten nicht zu.

Die Gehaltsbestimmungen der Pyridinnukleotide in den isolierten Leberzellen und der perfundierten Leber [Abb. 8, Tab. 6] zeigen, daß die durch das tert.-Butylhydroperoxyd hervorgerufenen Redoxveränderungen, entsprechend dem Schema 2 zu mehr als 95 % einer Oxydation von NADPH zuzuordnen sind.

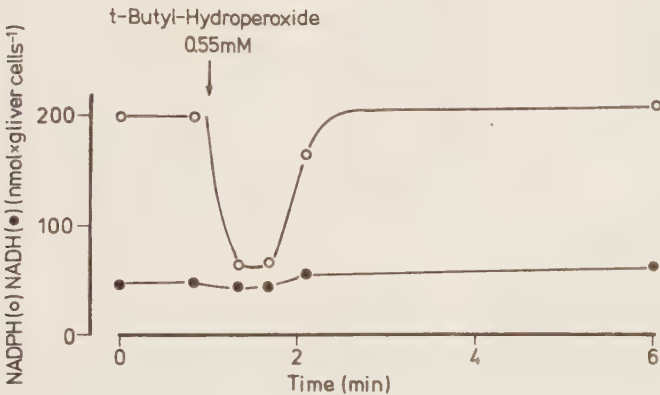


Abb. 8: NADPH- und NADH-Gehalte isolierter Leberzellen, 15.1 mg Zellprotein pro ml; 130 mg Zellprotein pro g Zellen Feuchtgewicht. Effekt von 0.55 mM tert.-Butylhydroperoxyd [vgl. auch Abb. 2, Tab.4] Inkubationsbedingungen vgl. Abschnitt II.

Die Reduktion der Hydroperoxyde verursacht einen reversiblen Übergang zu einem neuen stationären Zustand zwischen der Geschwindigkeit der NADPH-Oxydation durch die Glutathion-Reduktase und der NADPH-Nachlieferung durch NADP[H]-abhängige Dehydrogenasen. Die Bestimmung von tert.-Butylhydroperoxyd im Inkubationsansatz bestätigt, daß der ursprüngliche stationäre Zustand erst wieder nach der vollständigen Reduktion des Hydroperoxyds erreicht wird.

	Kontrolle	tert.-Butylhydroperoxyd [0.6 mM, 10 min]
	nMol pro g Leber Feuchtgewicht	
Nukleotide		
NADPH	240 ± 21	153 ± 16
NADP ⁺	73 ± 5	158 ± 14
NADH	70 ± 8	66 ± 6
NAD ⁺	546 ± 19	401 ± 24
ATP	2226 ± 107	1834 ± 58
ADP	551 ± 23	599 ± 51
AMP	137 ± 20	159 ± 31
Metabolite		
Glucose-6-Phosphat	52 ± 13	110 ± 13
Fructose-6-Phosphat	19 ± 3	37 ± 2
Glycerin-3-Phosphat	84 ± 13	165 ± 20

Tab. 6: Nukleotid- und Metabolit-Gehalte der hämoglobin-frei perfundierten Rattenleber. Effekt von tert.-Butylhydroperoxyd [0.6 mM]. Frierestops nach 35 Minuten Perfusion, Kontrollwerte ohne Hydroperoxyd, 6 - 9 Versuche, Hydroperoxydwerte 5 - 7 Versuche. Werte ± S.E.M. Der Wassergehalt der Kontroll- und mit Hydroperoxyd behandelten Lebern war 0.744 ± 0.003 bzw 0.722 ± 0.016 ml pro g Leber.

Die für die Umsetzung von tert.-Butylhydroperoxyd in isolierten Leberzellen benötigte Zeit ist von der Gegenwart von Glucose abhängig. So ist beispielsweise die Umsetzungsdauer von tert.-Butylhydroperoxyd in ohne Glucose inkubierten Zellen gegenüber den mit Glucose inkubierten Zellen von Hungertieren [24 Stunden] fast verdoppelt [Tab. 7].

Inkubations- bedingungen	zugewetztes tert.-BOOH	Nikotinamid- Nukleotid- Oxydation	Umsetzungs- dauer
	[mM]	[nMol/mg Protein]	[min]
gefüttert,	0.25	1.5	0.9
10 mM Glucose	0.5	1.9	2.2
	1.0	1.8	5.6
	2.0	1.9	9.6
gehungert [24 h],	0.4	1.5	4.2
10 mM Glucose			
gehungert [24 h],	0.4	1.5	7.7
ohne Glucose			

Tab. 7: Die Oxydation von Nikotinamid-Nukleotiden durch tert.-Butylhydroperoxyd und die Abhängigkeit der Umsetzungsdauer des Hydroperoxyds von Glucose in isolierten Leberzellen, 6.8 mg Zellprotein pro ml. Die Oxydation der Nikotinamid-Nukleotide wurde über Absorptionsmessungen bei 350 - 380 nm [vgl. Abb. 6] und einem $\Delta\epsilon$ von $4.7 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ berechnet. Als Umsetzungsdauer wird die zur halbmaximalen Auslenkung der Absorption bei 350 - 380 nm benötigte Zeit bezeichnet.

Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Hydroperoxyd-Umsetzung von Glucose deutet darauf hin, daß der oxydative Glucosemetabolismus an der Bereitstellung von Reduktions-äquivalenten für die Reduktion der Hydroperoxyde nach dem Schema 2 beteiligt ist.

Daß die NADPH-liefernden Dehydrogenasen des Pentosephosphat-Zyklus durch die Reduktion der Hydroperoxyde beeinflusst werden wird durch das Experiment der Abbildung 9 deutlich. Während der Umsetzung von tert.-Butylhydroperoxyd wird eine reversible Zunahme der Bildung von markiertem Kohlendioxyd aus 1- ^{14}C -Glucose beobachtet.

Außerdem führt die Umsetzung von tert.-Butylhydroperoxyd in der perfundierten Leber zu einer Stimulierung der Glykogenolyse und Glykolyse sowie zu einem Anstieg der Gewebsgehalte von Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat [25,34, 68, Tab. 6].

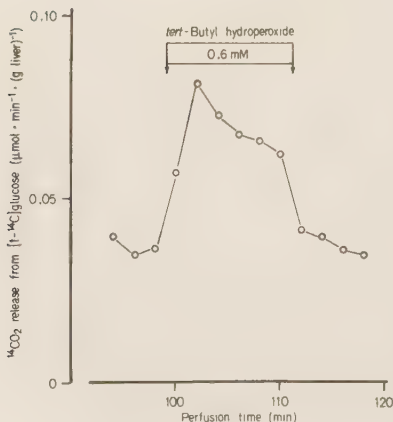


Abb. 9: Geschwindigkeit der Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ aus 1- ^{14}C -Glucose. Effekt von tert.-Butylhydroperoxyd in der perfundierten Leber. Die Geschwindigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung wurde aus der spezifischen Aktivität der Glucose im Perfusat berechnet. Konzentration der Glucose im Perfusat 10 mM.

Als weiterer Parameter für die Reduktion der Hydroperoxyde durch die Glutathion-Peroxydase gibt die Leber während der Infusion der Hydroperoxyde oxydiertes Glutathion [GSSG] in das Perfusat ab [Abb. 10].

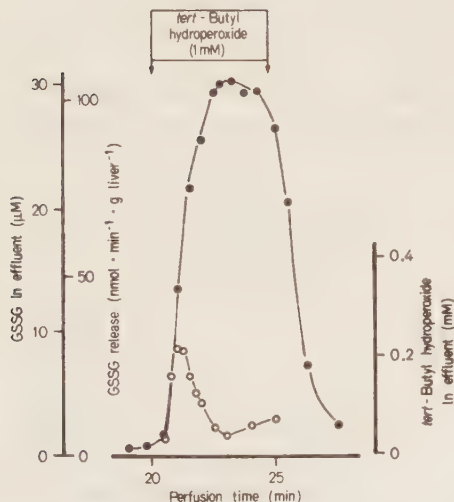


Abb. 10: Tert.-Butylhydroperoxyd [○] und Glutathiondisulfid [●] im ausströmenden Perfusat. Effekt von infundiertem tert.-Butylhydroperoxyd [1 mM], 37°C.

Die Freisetzung von Glutathiondisulfid ist reversibel und etwa linear abhängig von der Konzentration der infundierten Hydroperoxyde tert.-Butylhydroperoxyd und Cumolhydroperoxyd [Abb. 11]. Die Geschwindigkeit der GSSG-Ausschüttung beträgt in der perfundierten Leber bei 37°C etwa 3 % der Geschwindigkeit der Hydroperoxyd-Umsetzung, d.h. etwa 30 nMol GSSG pro Minute pro g Leber bei der Umsetzung von 1 µMol tert.-Butyl- oder Cumolhydroperoxyd pro Minute pro g Leber.

Eine GSSG-Freisetzung von 30 nMol GSSG pro Minute pro g Leber entspricht etwa einer Konzentration von 10 μ M GSSG im ausströmenden Perfusat. Über die intrazelluläre Konzentration von Glutathiondisulfid liegen keine verlässlichen Daten vor. Im Gleichgewicht der Glutathion-Reduktase-Reaktion dürfte die freie GSSG-Konzentration in Abwesenheit der Hydroperoxyde unter 10^{-8} M liegen [15].

Aus der linearen Abhängigkeit des GSSG-Ausstroms von der Geschwindigkeit der Hydroperoxyd-Umsetzung [Abb. 11], könnte geschlossen werden, daß zwischen der GSSG-Konzentration im Perfusat und in der Zelle eine Proportionalität besteht.

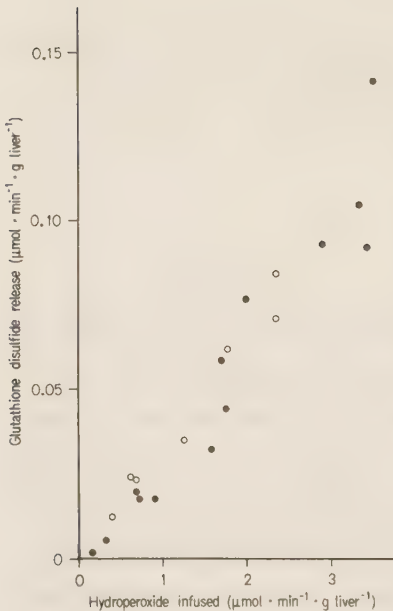


Abb. 11: Geschwindigkeiten der GSSG-Freisetzung und Hydroperoxyd-Infusion. Tert.-Butylhydroperoxyd [●], Cumolhydroperoxyd [○]. Es sind die nach 3 - 5 Minuten der Hydroperoxyd-Umsetzung erreichten maximalen GSSG-Konzentrationen aufgeführt.

III/3/3 Der Einfluß von tert.-Butylhydroperoxyd auf die Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen

In der perfundierten Leber führt tert.-Butylhydroperoxyd zu einer reversiblen Hemmung der Harnstoffbildung aus Ammoniumionen um 50 bis 60 % [Abb. 12] und zu einer entsprechend verminderten Aufnahme von Ammoniumionen. Diese Hemmung läßt sich mit der Abnahme des NADPH in der Leberzelle erklären. In Schema 1 ist dies dargestellt.

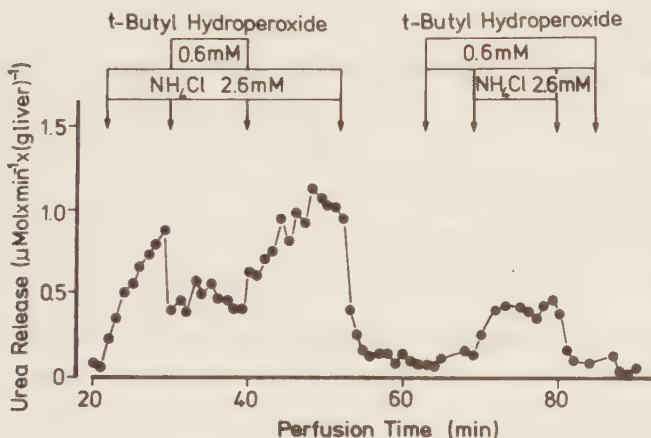


Abb. 12: Harnstoffbildung aus Ammoniumchlorid in der perfundierten Rattenleber. Effekt von tert.-Butylhydroperoxyd [0.6 mM]. Die Pfeile kennzeichnen die Zugabezeiten.

Um die NADPH-Abnahme als Erklärung des Hemmeffekts gegenüber anderen möglichen Erklärungen abzugrenzen, werden im folgenden einige Experimente gezeigt, welche sich mit dem

energetischen Zustand der Zelle und dem Thiol-Redoxstatus befassen.

Während der Umsetzung von zugesetzten Hydroperoxyden ist eine Verringerung der Sauerstoffaufnahme der Leber um 20 % zu beobachten [34], welche von einer geringfügigen Abnahme des ATP-Gehalts begleitet wird. Die Ursache dieser Atmungs-
hemmung ist noch ungeklärt.

Die Hemmung der Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen durch tert.-Butylhydroperoxyd wird nicht durch eine Abnahme des ATP-Gehalts verursacht. Dies folgt zum einen aus den kürzlich von Meijer et al [70] beschriebenen Experimenten, daß in Gegenwart des Entkopplers Dinitrophenol in isolierten Hepatozyten keine Hemmung der Harnstoffsynthese zu beobachten ist, wenn der ATP-Gehalt von 27.6 auf 16 μMol ATP pro g Leberzellen Feuchtgewicht, d.h. um 42 % absinkt, zum anderen aus den im folgenden beschriebenen Experimenten, in denen der ATP-Gehalt der Zelle durch Atractylat, ein Hemmstoff des Adeninnukleotid-Translokators [71,72], gesenkt wurde. In mit Ammoniumionen vorinkubierten Zellen führt Carboxyatractylat [0.5 mM] im Zeitraum von 3.5 Minuten zu einer Abnahme des ATP-Gehalts von 10.1 auf 7.0 nMol ATP pro mg Protein, d.h. um 31 %. Der NADP-Gehalt ist im gleichen Zeitraum leicht erniedrigt und die Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen nur geringfügig gehemmt [Inkubation C der Tab. 8 und Abb. 13].

Im stationären Zustand der Umsetzung von tert.-Butylhydroperoxyd [Inkubation B der Tab. 8, bei 12 min] ist der ATP-Gehalt von 9.3 auf 8.4 nMol ATP pro mg Protein, d.h.

um 10 % vergleichsweise wenig erniedrigt. Der NADP-Gehalt nimmt entsprechend der NADPH-Oxydation durch Hydroperoxyde von 1.0 auf 2.7 nMol NADP pro mg Protein zu.

	min	7	8	9	10	12	16
ATP	A	9.1	9.6	9.7	9.1	9.0	9.6
nMol/mg Protein	B	9.6	9.3	8.9	8.7	8.4	8.2
	C	10.0	10.1	10.5	8.1	7.0	6.8
NADP	A	1.1	1.3	1.2	1.3	1.3	0.8
nMol/mg Protein	B	---	1.0	2.2	2.5	2.7	0.9
	C	---	1.1	---	0.8	0.9	0.2

Tab. 8: ATP- und NADP-Gehalte isolierter Leberzellen, 9.6 - 10.4 mg Zellprotein pro ml, 89 mg Zellprotein pro g Zellen Feuchtgewicht. Inkubationsbedingungen vgl. Abschnitt II, 2 mM Ornithin, 10 mM Glucose, 2.1 mM Lactat, 0.3 mM Pyruvat. Alle Inkubationsansätze erhielten nach 5 Minuten Inkubation 5.5 mM Ammoniumchlorid. Der NADP-Gehalt vor der Ammoniumionen-Zugabe betrug 0.2 nMol NADP pro mg Protein.

Inkubation A: keine weitere Zugabe

Inkubation B: nach 8.5, 9.5 und 10.5 min jeweils 0.35 mM tert.-Butylhydroperoxyd

Inkubation C: nach 8.5 min 0.5 mM Carboxyattractylat.

Die Umsetzung des tert.-Butylhydroperoxyds führt unter diesen Bedingungen zu einer fast vollständigen Hemmung der Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen [Abb. 13], somit scheidet die durch die Hydroperoxyd-Umsetzung hervorgerufene Abnahme des ATP-Gehalts als Ursache der Hemmung der Harnstoff-

synthese durch tert.-Butylhydroperoxyd aus.

In der Abbildung 13 sind die Geschwindigkeiten der Harnstoffbildung aus Ammoniumionen in Gegenwart von tert.-Butylhydroperoxyd und Carboxyattractylat aufgeführt.

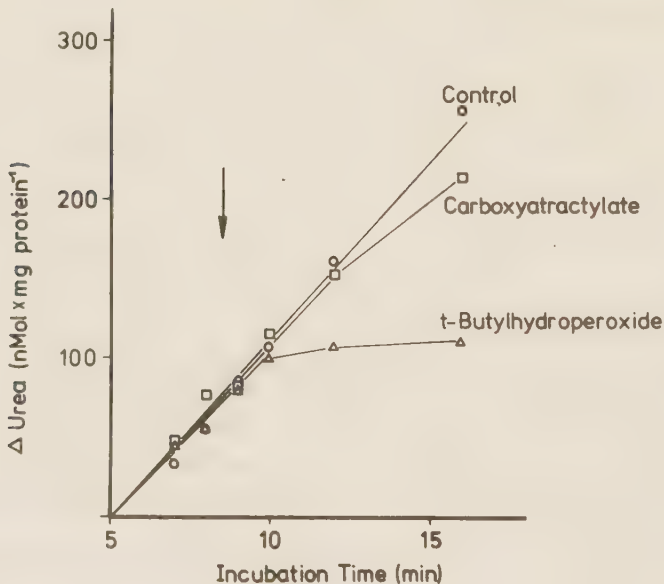


Abb. 13: Harnstoffbildung aus Ammoniumionen [5.5 mM] in isolierten Leberzellen, 9.6 - 10.4 mg Zellprotein pro ml, 89 mg Zellprotein pro g Zellen Feuchtgewicht. Effekt von tert.-Butylhydroperoxyd [1.15 mM] und Carboxyattractylat [0.5 mM]. Zugabe von Ammoniumchlorid nach 5 min Inkubation, Zugabe von tert.-Butylhydroperoxyd nach 8.5, 9.5 und 10.5 min jeweils in der Konzentration von 0.35 mM, Zugabe von Carboxyattractylat nach 8.5 min.

IV DISKUSSION

IV/1 Das NADP[H]-System der Mitochondrien und die Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen

Die Oxydation des NADP[H]-Systems der Mitochondrienmatrix durch Ammoniumionen wird durch mehrere experimentelle Hinweise, wie beispielsweise die Gehaltsbestimmungen der Nikotinamid-Nukleotide, die Anwendung der Indikator-metabolitpaar-Methode und die Hemmung der energieabhängigen Transhydrogenase durch Rhein, bestätigt.

Die nur geringfügige Beteiligung des mitochondrialen NAD[H]-Systems an der Umsetzung der Ammoniumionen bedeutet, daß bei der reduktiven Aminierung von α -Ketoglutarat zu Glutamat an der Glutamat-Dehydrogenase eine funktionelle Bevorzugung des NADP[H]-Systems vorliegt, welche am isolierten Enzym bei artifiziellen Inkubationsbedingungen nicht auftritt.

Der Grund für diese Bevorzugung dürfte auch wahrscheinlich nicht an der Glutamat-Dehydrogenase zu suchen sein. Er liegt eher in einem gegenüber dem NAD[H]-System der Mitochondrien negativeren Redoxpotential des NADP[H]-Systems und dem höheren Gehalt der Mitochondrien an NADP[H] [Tab. 2,3].

Die Diskussion um die Höhe des NADP[H]-Redoxpotentials der Mitochondrienmatrix ist noch nicht abgeschlossen. Ein NADP[H]-Redoxpotential der Mitochondrienmatrix von etwa -400 mV wird unterstützt durch die Hinweise auf ein Gleichgewicht zwischen der Isocitratdehydrogenase und dem NADP[H]-

System der Mitochondrienmatrix [73,8] [das Mittelpotential der mit NADP[H] reagierenden Isocitratdehydrogenase der Mitochondrien beträgt bei einer CO_2 -Konzentration von 1.2 mM -433 mV] und durch die von Ernster et al beschriebene Funktion der energieabhängigen Transhydrogenase [74-77].

Nach Krebs et al [14,15] beträgt das NADP[H]-Redoxpotential der Mitochondrienmatrix -310 mV. Eine Erklärung für dieses relativ hohe Redoxpotential könnten die von den Autoren zur Potentialberechnung verwendeten Gewebsgehalte der Ammoniumionen sein. Durch den Einfluß der verschiedenen Kompartimentierungsmöglichkeiten steht eine genaue Bestimmung der Aktivität freier Ammoniumionen in der Mitochondrienmatrix noch aus.

Die Existenz der energieabhängigen Transhydrogenase ist ebenfalls noch umstritten. Die Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen mit der stationären Oxydation mitochondrialer Triphosphopyridinnukleotide lassen sich durch die Wirkung einer energieabhängigen Transhydrogenase erklären [Schema 1]. Dies wird auch unterstützt durch die Hemmung der Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen durch Rhein, dem von Kean et al [57], Moyle und Mitchell [20] und Hoek et al [39] beschriebenen Hemmstoff der energieabhängigen Transhydrogenase.

IV/2 NADP[H]- und Thiol-Redoxsysteme

In der perfundierten Leber und in isolierten Leberzellen führt die Umsetzung von organischen Hydroperoxyden durch die

Aktivitäten der Glutathion-Peroxydase und Glutathion-Reduktase zu einer Oxydation von zellulärem NADPH [Schema 2]. Im Vergleich zu anderen NADPH-oxydierenden Prozessen der Leber, wie beispielsweise Lipogenese, Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen und mischfunktionelle Oxydation, ist die Geschwindigkeit der Hydroperoxyd-Reduktion von 3 - 4 μMol Hydroperoxyd pro Minute pro g Leber Feuchtgewicht sehr hoch.

Die von mehreren Autoren, wie beispielsweise Cohen und Hochstein [78] und Jacob und Jandl [79] erwähnte Beziehung zwischen dem Metabolismus der Hydroperoxyde und dem Pentosephosphat-Zyklus konnte bestätigt werden. Die Geschwindigkeit der Umsetzung von tert.-Butylhydroperoxyd ist in isolierten Leberzellen von gehungerten Ratten abhängig von Glucose [Tab. 7]. Die Umsetzung des Hydroperoxyds führt zu einer reversibel erhöhten Freisetzung von markiertem Kohlendioxyd aus 1- ^{14}C -Glucose [Abb. 9]. Der Mangel an Glucose verursacht eine verminderte NADPH-Nachlieferung über die Dehydrogenasen des Pentosephosphat-Zyklus. Die Flußgeschwindigkeit durch den Pentosephosphat-Zyklus, insbesondere die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase können gesteigert werden durch die während der Hydroperoxyd-Umsetzung auftretende NADPH-Oxydation [9,91] und durch die erhöhte Konzentration von oxydiertem Glutathion [9].

Weiterhin verursacht die Umsetzung der Hydroperoxyde in der perfundierten Leber eine Stimulierung der Glykogenolyse und der Glykolyse sowie eine Erhöhung der Gehalte von Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat [25,34, Tab. 6].

Die Existenz eines NADPH-regenerierenden Systems erschwert allerdings die Erklärung der schon bei kleinen Geschwindigkeiten der Hydroperoxyd-Umsetzung auftretenden Freisetzung von Glutathiondisulfid in das Perfusat [Abb. 11]. Zumindest bei den kleinen Geschwindigkeiten der Hydroperoxyd-Umsetzung dürfte die Nachlieferung von NADPH einen Anstieg der Konzentration von oxydiertem Glutathion verhindern. Es besteht die Möglichkeit, daß die Reaktionen des Schema 2 durch die Glutathion-Reduktase in situ begrenzt werden. Die Michaelis-Konstanten der Glutathion-Reduktase werden für NADPH mit 8 μM , die für Glutathiondisulfid mit 63 μM angegeben [10], d.h. bei den für die Zelle anzunehmenden Konzentrationen von Glutathiondisulfid von $< 10^{-8}$ M, ist die Glutathion-Reduktase weitgehend substratlimitiert.

Die Geschwindigkeit der Ausschüttung von oxydiertem Glutathion scheint ein Indikator für den Oxydationszustand des zellulären Glutathion-Systems zu sein. Der GSSG-Ausstrom ist linear abhängig von der Geschwindigkeit der Hydroperoxyd-Umsetzung [Abb. 11]. Unter diesen Bedingungen treten weder reduziertes Glutathion [28] noch cytosolische Markerenzyme, wie die Lactatdehydrogenase aus der Zelle aus. Die Ausschüttung von oxydiertem Glutathion tritt ebenfalls auf, wenn das zelluläre Glutathion durch Diazoverbindungen, wie beispielsweise "Diamid" oxydiert wird [80].

Ein Transport von oxydiertem Glutathion aus der Zelle würde der Positivierung des Glutathion-Redoxpotentials entgegenwirken. In Erythrozyten und Augenlinsen wurde ein ATP-

abhängiges Transportsystem für Glutathiondisulfid beschrieben [81,82]. Auch in der perfundierten Leber und in isolierten Leberzellen gibt es Hinweise auf eine ungleiche Verteilung von Glutathiondisulfid über die Zellmembran und auf einen gerichteten Transport von GSSG aus der Zelle in den Extrazellulärraum. Infundiertes Glutathiondisulfid verursacht keine Änderung der Extinktionsdifferenz im Bereich der Dihydrobande der Nikotinamid-Nukleotide [66]. Auch nach der Infusion der markierten Substrate, Glutathiondisulfid, reduziertes Glutathion und Ophthalmalsäure, eine Glutathion-analoge, schwefellose Verbindung, wurde keine Aufnahme von Aktivität in die Zelle nachgewiesen [83].

Ein von der Konzentration von Glutathiondisulfid abhängiges, ATP-erforderndes Transportsystem für Glutathiondisulfid wurde in Membranhüllen von Erythrozyten beschrieben [84]. Da bei den kleinen GSSG-Konzentrationen dieser Transport als zu langsam für den GSSG-turnover angesehen wird, vermuten die Autoren ebenfalls, daß das GSSG-Transportsystem als Hilfsystem bei extremer oxydativer Belastung die Konzentration von Glutathiondisulfid in den Erythrozyten niedrig hält. Eine hohe Konzentration von Glutathiondisulfid führt in Erythrozyten durch die Bildung von gemischten Disulfiden aus Glutathion und Cystein zu einer Inaktivierung des Hämoglobins [85].

Etwa ein Drittel des gesamten zellulären Glutathions ist als gemischtes Disulfid, beispielsweise an Cystein, Coenzym A, Albumin und Hämoglobin gebunden [86-88]. Es ist

deshalb nicht verwunderlich, daß eine Veränderung im Glutathion-Redoxzustand für eine Vielzahl physiologischer Prozesse von Bedeutung ist. Beispielsweise wurde durch eine Thioloxydation eine Hemmung der Zellteilung [89] und der Proteinsynthese [90] sowie durch die Gabe von Glutathion eine Stimulierung der Insulin-Freisetzung beobachtet [45].

V ZUSAMMENFASSUNG

1. Die zellulären NADP[H]-Systeme wurden im offenen System der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber und in isolierten Leberzellen durch die experimentelle Variation von Stoffwechselzuständen untersucht. Die Perturbation von Fließgleichgewichten erfolgte durch die permeablen Substrate Ammoniumchlorid und die organischen Hydroperoxyde, tert.-Butylhydroperoxyd und Cumolhydroperoxyd.
2. Intramitochondrial führen Ammoniumionen durch die reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat zu Glutamat an der Glutamat-Dehydrogenase zu einer Oxydation von Nikotinamid-Nukleotiden. Diese Oxydation ist zu über 90 % dem NADP[H]-System der Mitochondrienmatrix zugeordnet.
3. Bei der Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen ist eine mitochondriale Wasserstoffübertragung von NADH auf NADP⁺ wahrscheinlich. Rhein, ein als Hemmstoff der energieabhängigen Transhydrogenase bekanntes Anthrachinonderivat, hemmt die Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen zu etwa 60 % und führt bei unverändertem NAD-Gehalt zu einer starken Oxydation von NADPH. Die ohne Beteiligung der Glutamat-Dehydrogenase ablaufende Harnstoffsynthese aus Glutamin wird durch Rhein nicht beeinflusst.
4. Organische Hydroperoxyde, wie tert.-Butylhydroperoxyd

und Cumolhydroperoxyd führen über die gekoppelten Reaktionen der Glutathion-Peroxydase und Glutathion-Reduktase [Schema 2] zu einer starken Oxydation von zellulärem NADPH. Außerdem wird während der Hydroperoxyd-Umsetzung ein reversibler Ausstrom von Glutathiondisulfid in den Extrazellulärraum und eine Abnahme des ATP-Gehalts um 5 - 10 % beobachtet.

5. Die Geschwindigkeit der Reduktion der Hydroperoxyde ist weit höher als die anderer NADPH-oxydierender Prozesse, wie Lipogenese, Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen und mischfunktionelle Oxydation. Die Umsetzung der Hydroperoxyde mit der stationären Oxydation der NADP[H]-Systeme kann als Modellsystem für zukünftige Untersuchungen NADP[H]-abhängiger Prozesse dienen.
6. Als ein Beispiel für eine solche Konkurrenz zweier NADP[H]-abhängiger Prozesse um das NADPH wird die Hemmung der Harnstoffsynthese aus Ammoniumionen durch tert.-Butylhydroperoxyd dargestellt.

VI LITERATURVERZEICHNIS

1. Warburg, O. & Christian, W. [1933] Biochem. Z. 266, 377 - 411.
2. Warburg, O., Christian, W. & Griesse, A. [1935] Biochem. Z. 282, 157 - 205.
3. Holzer, H., Schultz, G. & Lynen, F. [1956] Biochem. Z. 328, 252 - 263.
4. Bücher, Th. & Klingenberg, M. [1958] Angew. Chem. 70, 552 - 570.
5. Jacobson, K. B. & Kaplan, N. O. [1957] J. Biol. Chem. 226, 603 - 613.
6. Glock, G. F. & Mc Lean, P. [1956] Expl. Cell Res. 11, 234 - 236.
7. Lehninger, A. L. [1951] J. Biol. Chem. 190, 345 - 359.
8. Bücher, Th. & Sies, H. [1975] in: Regulation of Metabolism in isolated Liver Cells [J. M. Tager, H. D. Söling, J. R. Williamson, eds] Asp. Biol. und Med. Press, Amsterdam, im Druck.
9. Eggleston, L. V. & Krebs, H. A. [1974] Biochem. J. 138, 425 - 435.
10. Carlberg, J. & Mannervik, B. [1975] J. Biol. Chem. 250, 5475 - 5480.
11. Bücher, Th. [1970] in: Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases [H. Sund, ed.] S. 439 - 461, Springer Verlag, Berlin.

12. Hohorst, H. J., Kreutz, F. H. & Bücher, Th. [1959]
Biochem. Z. 332, 18 - 46.
13. Williamson, D. H., Lund, P. & Krebs, H. A. [1967]
Biochem. J. 103, 514 - 527.
14. Krebs, H. A. & Veech, R. L. [1969] in: The Energy
Level and Metabolic Control in Mitochondria [S.
Papa, J. M. Tager, E. Quagliariello, E. C. Slater,
eds] S. 329 - 382, Adriatica Editrice, Bari.
15. Veech, R. L., Eggleston, L. V. & Krebs, H. A. [1969]
Biochem. J. 115, 609 - 619.
16. Gumaa, K. A., Mc Lean, P. & Greenbaum, A. L. [1971]
Essays in Biochemistry 7, 39 - 86.
17. Veech, R. L. & Guynn, R. W. [1974] in: Regulation of
Hepatic Metabolism [F. Lundquist, N. Tygstrup, eds]
S. 337 - 357, Munksgaard, Kopenhagen.
18. Greenbaum, A. L., Gumaa, K. A. & Mc Lean, P. [1971]
Arch. Biochem. Biophys. 143, 617 - 633.
19. Williamson, J. R. [1969] in: The Energy Level and
Metabolic Control in Mitochondria [S. Papa, J. M.
Tager, E. Quagliariello, E. C. Slater, eds] S.
385 - 400, Adriatica Editrice, Bari.
20. Moyle, J. & Mitchell, P. [1973] Biochem. J. 132, 571
- 585.
21. Scholz, R. & Bücher, Th. [1965] in: Control of Energy
Metabolism [B. Chance, R. W. Estabrook, J. R. William-
son, eds] S. 393 - 414, Academic Press, New-York.
22. Bücher, Th., Brauser, B., Conze, A., Klein, F., Lang-
guth, O. & Sies, H. [1972] Eur. J. Biochem. 27,
301 - 317.

23. Berry, M. N. & Friend, D. S. [1969] J. Cell Biol. 43, 506 - 520.
24. Wollenberger, A., Ristau, O. & Schoffa, G. [1960] Pflügers Arch. Ges. Physiol. 270, 399 - 412.
25. Summer, K. H. [1973] Biochemische Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Universität Tübingen.
26. Bergmeyer, H. U. [1974] Methoden der Enzymatischen Analyse, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim.
27. Kirsten, E., Gerez, C. & Kirsten, R. [1963] Biochem. Z. 337, 312 - 319.
28. Menzel, H. [1973] Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Tübingen.
29. Häussinger, D., Weiss, L. & Sies, H. [1975] Eur. J. Biochem. 52, 421 - 431.
30. Beisenherz, B., Boltze, H. J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E. & Pfeleiderer, G. [1953] Z. Naturforschung 8b, 555 - 577.
31. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry [1961] Pergamon Press, Oxford.
32. Bücher, Th., Krejci, K., Rüssmann, W., Schnitger, H. & Wesemann, W. [1964] in: Rapid Mixing and Sampling Techniques in Biochemistry [B. Chance, R. H. Eisenhardt, Q. H. Gibson, K. K. Lonberg-Holm, eds] S. 255, Academic Press, New-York.
33. Lagunas, R., Mc Lean, P. & Greenbaum, A. L. [1970] Eur. J. Biochem. 15, 179 - 190.

34. Sies, H., Gerstenecker, C., Summer, K. H., Menzel, H. & Flohé, L. [1974] in: Glutathione [L. Flohé, H. Ch. Benöhr, H. Sies, H. D. Waller, A. Wendel, eds] S. 261 - 275, Thieme Verlag, Stuttgart.
35. Weibel, E. R., Stäubli, W., Gnägi, H. R. & Hess, F. A. [1969] J. Biol. Chem. 42, 68 - 91.
36. Papenberg et al [1961] in: Zur Bedeutung der freien Nukleotide, 11. Kolloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie, Mosbach, S. 25 - 35, Springer Verlag, Berlin.
37. Klingenberg, M. [1961] in: Zur Bedeutung der freien Nukleotide, 11. Kolloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie, Mosbach, S. 82 - 114, Springer Verlag, Berlin.
38. Heldt, H. W., Greif, N., Klingenberg, M., Scholz, R., Panten, U., Grunst, J. & Bücher, Th. [1965] J. Biol. Chem. 240, 4659 - 4661.
39. Hoek, J. B., Ernster, L., de Haan, E. J. & Tager, J. M. [1974] Biochim. Biophys. Acta 333, 546 - 559.
40. Chamalaun, R. F. A. M. & Tager, J. M. [1970] Biochim. Biophys. Acta 222, 119 - 134.
41. Sies, H., Häussinger, D. & Grosskopf, M. [1974] Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 305 - 320.
42. Sies, H. [1971] Chem. Biol. Interactions 3, 308 - 309.
43. Goldin, B. R. & Frieden, C. [1971] in: Current Topics in Cellular Regulation [B. L. Herecker, E. R. Stadtman, eds] 4, 77 - 117.

44. Klingenberg, M. & Slenczka, W. [1959] Biochem. Z.
331, 486 - 517.
45. Hellman, B., Idahl, L. A., Lernmark, A., Sehlin, J.
& Täljedahl, J. B. [1975] Biochim. Biophys. Acta
392, 101 - 109.
46. Hoek, J. B. & Tager, J. M. [1973] Biochim. Biophys.
Acta 325, 197 - 212.
47. De Haan, E. J., Tager, J. M. & Slater, E. C. [1964]
Biochim. Biophys. Acta 89, 375 - 377.
48. De Haan, E. J., Tager, J. M. & Slater, E. C. [1967]
Biochim. Biophys. Acta 131, 1 - 13.
49. Quagliariello, E., Papa, S., Saccone, C., Palmieri, F.
& Francavilla, A. [1965] Biochem. J. 95, 742 - 748.
50. Papa, S., Tager, J. M., Francavilla, A., de Haan, E. J.
& Quagliariello, E. [1967] Biochim. Biophys. Acta
131, 14 - 28.
51. Tager, J. M. [1966] in: Regulation of Metabolic Pro-
cesses in Mitochondria [J. M. Tager, S. Papa, E.
Quagliariello, E. C. Slater, eds] Biochim. Biophys.
Acta Library 7, 202 - 217, Elsevier, Amsterdam.
52. Papa, S., Tager, J. M., Francavilla, A. & Quagliari-
ello, E. [1969] Biochim. Biophys. Acta 172, 20 - 29.
53. Williamson, J. R., Gimpel, J. A., Meijer, A. J., De
Leeuw, G. & Refino, C. [1975] in: Regulation of
Metabolism in Isolated Liver Cells [J. M. Tager,
H. D. Söling, J. R. Williamson, eds] Asp. Biol.
and Med. Press, Amsterdam, im Druck.

54. Häussinger, D. [1975] Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität München.
55. LaNoue, K. F., Meijer, A. J. & Brouwer, A. [1974] Arch. Biochem. Biophys. 161, 544 - 550.
56. Sies, H. [1974] Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 319 - 320.
57. Kean, E. A., Gutman, M. & Singer, T. P. [1971] J. Biol. Chem. 246, 2346 - 2353.
58. Sies, H., Summer, K. H., Häussinger, D. & Bücher, Th. [1975] in: Regulation of Metabolism in Isolated Liver Cells [J. M. Tager, H. D. Söling, J. R. Williamson, eds] Asp. Biol. and Med. Press, Amsterdam, im Druck.
59. Sies, H., Summer, K. H. & Bücher, Th. [1975] FEBS Lett. 54, 274 - 278.
60. Mills, G. C. [1957] J. Biol. Chem. 229, 189 - 197.
61. Flohé, L. & Schlegel, W. [1971] Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1401 - 1410.
62. Flohé, L., Günzler, A. & Schock, H. H. [1973] FEBS Lett. 32, 132 - 134.
63. Beutler, E. [1974] in: Glutathione [L. Flohé, H. Ch. Benöhr, H. Sies, H. D. Waller, A. Wendel, eds] S. 109 - 113, Thieme Verlag, Stuttgart.
64. Mannervik, B. [1974] in: Glutathione [L. Flohé, H. Ch. Benöhr, H. Sies, H. D. Waller, A. Wendel, eds] S. 114 - 120, Thieme Verlag, Stuttgart.

65. Sies, H. & Summer, K. H. [1975] Eur. J. Biochem. 57, 503 - 512.
66. Sies, H., Summer, K. H. & Grosskopf, M. [1975] in: Regulation of Metabolism in Isolated Liver Cells [J. M. Tager, H. D. Söling, J. R. Williamson, eds] Asp. Biol. and Med. Press, Amsterdam, im Druck.
67. Srivastava, S. K., Awasthi, Y. S. & Beutler, E. [1974] Biochem J. 139, 289 - 295.
68. Sies, H., Gerstenecker, C., Menzel, H. & Flohé, L. [1972] FEBS Lett. 27, 171 - 175.
69. Sund, H. & Theorell, H. [1963] in: The Enzymes [P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, eds] Vol. 7, 26 - 83.
70. Meijer, A. J., Gimpel, J. A., DeLeeuw, G. A., Tager, J. M. & Williamson, J. R. [1975] J. Biol. Chem. 250, 7728 - 7738.
71. Klingenberg, M. & Pfaff, E. [1966] in: Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria [J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, E. C. Slater, eds] S. 180 - 201, Elsevier, Amsterdam.
72. Henderson, P. J. F. & Lardy, H. A. [1970] J. Biol. Chem. 245, 1319 - 1326.
73. Smith, C. M., Beach, R. L. & Plaut, G. W. E. [1975] Abstr. 10th FEBS Meeting, Nr. 717, Paris.
74. Danielson, L. & Ernster, L. [1963] Biochem. Z. 338, 188 - 205.
75. Lee, C. P. & Ernster, L. [1964] Biochim. Biophys. Acta 81, 187 - 190.

76. Rydström, J., Teixeira da Cruz, A. & Ernster, L. [1970] Eur. J. Biochem. 17, 56 - 62.
77. Lee, C. P. & Ernster, L. [1968] Eur. J. Biochem. 3, 385 - 390.
78. Cohen, C. & Hochstein, P. [1963] Biochemistry 2, 1420 - 1428.
79. Jacob, H. S. & Jandl, J. H. [1966] J. Biol. Chem. 241, 4243 - 4250.
80. Kosower, N. S., Kosower, E. M., Wertheim, B. & Correa, W. S. [1969] Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 593 - 596.
81. Srivastava, S. K. & Beutler, E. [1969] Biochem. J. 112, 421 - 425.
82. Srivastava, S. K. & Beutler, E. [1969] J. Biol. Chem. 244, 9 - 16.
83. Hahn, R. [1975] Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Tübingen.
84. Prchal, J., Srivastava, S. K. & Beutler, E. [1975] Blood 46, 111 - 117.
85. Srivastava, S. K. & Beutler, E. [1970] Biochem. J. 119, 353 - 357.
86. Meister, A. [1975] in: Metabolic Pathways [D. M. Greenberg, ed.] Vol. II Metabolism of Sulfur Compounds, S. 101 - 188, Academic Press, New-York.

87. Jackson, R. C., Horrap, K. R. & Smith, C. A. [1968]
Biochem. J. 110, 37p.
88. Glutathione [L. Flohé, H. Ch. Benöhr, H. Sies, H. D.
Waller, A. Wendel, eds] Thieme Verlag, Stuttgart,
1974.
89. Barron, E. S. G. [1951] Advanc. Enzymol. 11, 201 - 266.
90. Kosower, N. S. & Kosower, E. M. [1974] in: Glutathione
[L. Flohé, H. Ch. Benöhr, H. Sies, H. D. Waller, A.
Wendel, eds] S. 276 - 286, Thieme Verlag, Stuttgart.
91. Holton, D., Procsal, D. & Chang, H. L. [1976] Biochem.
Biophys. Res. Commun. 68, 436 - 441.
92. Klingenberg, M. [1965] Biochem. Z. 343, 479 - 503.

LEBENS LAUF

- 1947, 3.1. in Überlingen geboren, Eltern: Alwin Summer, Angestellter, Franziska Summer, geb. Böhler.
- 1953 - 1956 Grundschule in Überlingen
- 1956 - 1966 naturwissenschaftliches Gymnasium Überlingen, Abschluß mit Abitur.
- 1966 - 1973 Studium der physiologischen Chemie und Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Diplomhauptprüfung in Biochemie, Organische Chemie und Pharmakologie. Thema der Diplomarbeit: Pyridinnukleotide und Glykolyseintermediate in der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber bei Umsatz von exogenem Hydroperoxyd [Anleitung Privatdozent, Dr. L. Flohé, Institut für Physiologische Chemie und Biochemie der Universität Tübingen].
- Januar 1974 - Anfertigung vorliegender Dissertation im
März 1976 Institut für Physiologische Chemie, Physiologische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter der Anleitung von Herrn Privatdozent, Dr. H. Sies, Wiss. Rat.

